

MIYASHITA ET AL.

PAT-NO: JP359003261A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 59003261 A

TITLE: QUANTITATIVE MEASUREMENT OF CHOLESTEROL

PUBN-DATE: January 9, 1984

INVENTOR-INFORMATION:

NAME

MIYASHITA, YOSHINOBU

KODERA, HIROMASA

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME

WAKO PURE CHEM IND LTD

COUNTRY

N/A

APPL-NO: JP57112414

APPL-DATE: June 29, 1982

INT-CL (IPC): G01N033/92, G01N021/75

US-CL-CURRENT: 264/532, 436/71

ABSTRACT:

PURPOSE: To carry out diagnosis of various geriatric diseases, by a method wherein cholesterol in a living body specimen is reacted with digitonin and the intensity of diffused light from the formed fine particle is measured to quantitatively measure cholesterol in good preciseness in a reduced amount of the specimen as compared to a nephelometry method.

CONSTITUTION: Cholesterol or cholesterol ester is extracted from a living body specimen such as blood by acetone and, after cholesterol ester is hydrolyzed by a KOH solution, the extract is neutralized by acetic acid. One drip of a surfactant (pref., a nonionic one) is added to the

neutralized  
specimen to be well mixed therein. In the next step, 50% ethanol  
solution of  
digitonin is added to and mixed in the specimen and, after the  
mixture is  
allowed to stand for about 20min at a room temp., the intensity of  
diffused  
light of the incident light from a laser source is measured by a  
laser  
nephelometer. The surfactant uniformly disperses fine particles of  
digitonide  
formed through the reaction of cholesterol and digitonin. The  
measured value  
is collated with a calibration curve obtained by using a known amount  
of  
cholesterol to measure the cholesterol concn. in the specimen in good  
preciseness.

COPYRIGHT: (C)1984,JPO&Japio

DERWENT-ACC-NO: 1984-040328

DERWENT-WEEK: 198407

COPYRIGHT 2006 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Cholesterol determ. in living body sample -  
by treating with digitonin, irradiating with light and  
measuring light scattering

PATENT-ASSIGNEE: WAKO PURE CHEM IND LTD[WAKP]

PRIORITY-DATA: 1982JP-0112414 (June 29, 1982)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE
PAGES MAIN-IPC		
JP 59003261 A	January 9, 1984	N/A
006 N/A		

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO
APPL-DATE		
JP 59003261A	N/A	1982JP-0112414
June 29, 1982		

INT-CL (IPC): G01N021/75, G01N033/92

ABSTRACTED-PUB-NO: JP 59003261A

BASIC-ABSTRACT:

Method comprises treating cholesterol in a living body samole (e.g. blood serum) with digitonin, applying light to fine particles of digitonide formed, and measuring the intensity of the scattered light.

In the method, the content of digitonide cholesterol in the turbid liq. is a low concn. 0.05-1 mg./dl. Cholesterol and/or cholesterol ester are extracted from living body samples e.g. blood serum by the usual method.

As the nephelo-metric determ. of the digitonide turbid liq. can be accurately

carried out, the determination of cholesterol can be accurately achieved by using a small amount of sample.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

TITLE-TERMS: CHOLESTEROL DETERMINE LIVE BODY SAMPLE TREAT DIGITONIN  
IRRADIATE  
LIGHT MEASURE LIGHT SCATTERING

DERWENT-CLASS: B04

CPI-CODES: B01-D02; B04-C02; B07-A02; B11-C07B; B12-K04;

CHEMICAL-CODES:

Chemical Indexing M1 \*01\*

Fragmentation Code

M423 M760 M903 N102 P831 V600 V614

Chemical Indexing M5 \*03\*

Fragmentation Code

M750 M903 M910 N102 P831 S005 S032 S131 S133 S134

S142 S143 S303 S317 S503 U560 U563

Chemical Indexing M5 \*04\*

Fragmentation Code

M781 M903 P831 S131 S132 S133 S134 S142 S143 S202

S303 S315 S500 S502 S515 S800 S803 S833 T100 T133

T138 T142 U500 U501

Chemical Indexing M6 \*02\*

Fragmentation Code

M903 P831 R514 R611 R627 R638

UNLINKED-DERWENT-REGISTRY-NUMBERS: 0148U

UNLINKED-RING-INDEX-NUMBERS: 05686; 06673

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C1984-017080

Non-CPI Secondary Accession Numbers: N1984-030445

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 59-003261

(43)Date of publication of application : 09.01.1984

---

(51)Int.Cl.

G01N 33/92  
G01N 21/75

---

(21)Application number : 57-112414

(71)Applicant : WAKO PURE CHEM IND LTD

(22)Date of filing : 29.06.1982

(72)Inventor : MIYASHITA YOSHINOBU  
KODERA HIROMASA

---

### (54) QUANTITATIVE MEASUREMENT OF CHOLESTEROL

#### (57)Abstract:

PURPOSE: To carry out diagnosis of various geriatric diseases, by a method wherein cholesterol in a living body specimen is reacted with digitonin and the intensity of diffused light from the formed fine particle is measured to quantitatively measure cholesterol in good preciseness in a reduced amount of the specimen as compared to a nephelometry method.

CONSTITUTION: Cholesterol or cholesterol ester is extracted from a living body specimen such as blood by acetone and, after cholesterol ester is hydrolyzed by a KOH solution, the extract is neutralized by acetic acid. One drip of a surfactant (pref., a nonionic one) is added to the neutralized specimen to be well mixed therein. In the next step, 50% ethanol solution of digitonin is added to and mixed in the specimen and, after the mixture is allowed to stand for about 20min at a room temp., the intensity of diffused light of the incident light from a laser source is measured by a laser nephelometer. The surfactant uniformly disperses fine particles of digitonide formed through the reaction of cholesterol and digitonin. The measured value is collated with a calibration curve obtained by using a known amount of cholesterol to measure the cholesterol concn. in the specimen in good preciseness.

---

### LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or

application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

## ⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—3261

⑤ Int. Cl.<sup>3</sup>  
G 01 N 33/92  
21/75

識別記号

庁内整理番号  
8305—2G  
6637—2G

⑬ 公開 昭和59年(1984)1月9日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 6 頁)

## ⑭ コレステロールの定量方法

⑪ 特 願 昭57—112414

⑫ 出 願 昭57(1982)6月29日

⑬ 発 明 者 宮下佳展

大阪市旭区高殿7丁目14番17号

⑭ 発 明 者 小寺宏征

尼崎市東園田町6丁目83番2号

⑮ 出 願 人 和光純薬工業株式会社

大阪市東区道修町3丁目10番地

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

コレステロールの定量方法

## 2. 特許請求の範囲

(1) 生体試料中に含まれるコレステロールにジギトニンを反応させて生成するジギトニドの微粒子に光を当て、その散乱光の強さを測定することによつて含有量を求めることを特徴とするコレステロールの定量方法。

(2) 混濁液中のジギトニドのコレステロール含量が約0.05～1 mg/dlの低濃度域にある特許請求の範囲第1項記載のコレステロールの定量方法。

(3) 生体試料から自体公知の方法によりコレステロール又はノ及びコレステロールエステルを抽出し、抽出されたコレステロール又はノ及び抽出されたコレステロールエステルを自体公知の方法により加水分解して生成したコレステロールにジギトニンを反応させる特許請求の範囲第1項又は第2項記載のコレステロールの定量方法。

(4) 生体試料が血清であり、抽出溶媒がアセトン

(1)

又はノ及びエタノール溶液である特許請求の範囲第3項記載のコレステロールの定量方法。

(5) ジギトニンが50 mgエタノール溶液である特許請求の範囲第4項記載のコレステロールの定量方法。

(6) 散乱光の強さを比色計で測定する特許請求の範囲第1項～第5項記載のコレステロールの定量方法。

(7) レーザー光源から照射される散乱光の強さをレーザーネフエロメーターで測定する特許請求の範囲第6項記載のコレステロールの定量方法。

(8) コレステロールエステルを水酸化カリウム溶液を用いて加水分解する特許請求の範囲第3項記載のコレステロールの定量方法。

(9) ジギトニドの生成を弱酸性下で行う特許請求の範囲第1項～第8項記載のコレステロールの定量方法。

(10) ジギトニドの浮遊を一層安定化させるために界面活性剤を用いる特許請求の範囲第1項～第9項記載のコレステロールの定量方法。

(2)

01)界面活性剤が非イオン界面活性剤である特許請求の範囲第10項記載のコレステロールの定量方法。

### 3 発明の詳細な説明

本発明は、コレステロールの定量方法に関するものである。さらに詳しくは、生体試料中のコレステロールをジギトニドとし、比濁分析により定量するコレステロールの定量方法に関するものである。

生体試料、たとえば血清試料中のコレステロール含量の測定は、肝実質障害、甲状腺代謝異常、胆道閉塞、あるいは種々の脂質代謝障害のほか、動脈硬化、高血圧などの成人病の診断に極めて重要なものである。

コレステロールの従来の定量法としては、主に比色法であり、リーベルマン＝ブルハルト反応、ポートルエンスルホン酸反応、スルホサリチル酸反応、塩化鉄反応、O-フタルアルデヒド反応などがある。

さらに最近になり、コレステロールにコレステ

(3)

コレステロールは適当な溶媒中でジギトニンと不溶性の分子複合体であるジギトニドを形成する。このジギトニド形成は、コレステロールの3位の水酸基に特異的であり、3位の水酸基がエステル化されたものとは結合しない。

このジギトニドの混濁の強さを比色計を用い、照射光の減少をみる比濁法で測る試みがなされている。

1952年には、ボラクラは血清をスベリーウェブ法に従ってコレステロールをジギトニドとして沈澱させ、その沈澱をガラス棒で再浮遊させたものを比色計で比濁する方法を報告している。(ジャーナル オブ ラボラトリー アンド クリニカル メディシン 39巻 791～794頁、1952年)

この方法では混濁液が均一とならず、正確な値が得られないことから、1957年にはカステロらが混濁液に界面活性剤のフイーン20の添加を試みている。(アメリカン ジャーナル オブ クリニカル パソロジー、27巻、108～115

(5)

ロールオキシダーゼを作用させ、生成する過酸化水素にベルオキシダーゼ共存下で被酸化性呈色試薬を反応させ、その呈色の強さを比色定量する、酵素を用いる方法が見出されている。コレステロールエステルの測定には、コレステロールエステラーゼを作用させ、遊離型のコレステロールとしてのコレステロールオキシダーゼを作用させる。

しかるに、これら従来法にはそれぞれ難点がある。

前者の比色法では、いずれも永酢酸、無水酢酸、あるいは硫酸などの薬品を用い、取扱い上特別の注意を要し、その上自動分析装置への適用も通常の適用の仕方では機器の損傷を引起す為好ましくない。

後者の酵素法では、生成する過酸化水素をベルオキシダーゼの共存下で被酸化性指示薬を酸化発色させており、生体試料中の還元性共存物質、たとえばアスコルビン酸、グルタチオン、ビリルビンなどの影響は避け得ない上、高価な酵素を用いねばならず経済的負担が大きい。

(4)

頁、1957年)

この場合でも分散粒子が大きく、不安定な為温度ならびに測定時間を一定にしなければよい再現性が得られないことが記載されている。

照射する光の透過率によつてその濁度を求めるこれらの比濁法では、多量の試料を用いる必要があり、混濁液中のコレステロールの含有量は1～5mg/dlとなつている。因にこのような高濃度にあつては、生成、浮遊する粒子も大きく成長し、均一かつ安定に浮遊させておくことが困難となつており、測定精度の点で実用に供し難く普及するに至っていない。

本発明者らは、これらの欠点に鑑み鋭意研究の結果、ジギトニドの混濁度は混濁液中のジギトニドの散乱光の強さを測定すれば定量的に求められることを見出し、本発明を完成するに至つた。

即ち、本発明は生体試料に含まれるコレステロールにジギトニンを反応させて生成するジギトニドの微粒子に光を当て、その散乱光の強さを測定することによつて含有量を求めることを特徴と

(6)



するコレステロールの定量方法である。

本発明者らは、混濁液中のジギトニドのコレステロール含量が約0.05～1 mg/dlの低濃度域にあつては、生成、浮遊する粒子が細かく、かつ浮遊安定性が極めてよいことを見出した。

ジギトニド混濁液の測定が散乱光測定、すなわち比濁法によつて精度よく測定し得るということは全く予想されないことであつた。

なお、混濁液に光を当て散乱光する光の強さを測定する比濁法によれば比濁法と比較して一般的に少量の試料での定量が可能である。

例を挙げて本発明を更に詳細に説明すると次のとおりである。

血清0.2 mlにアセトン-エタノール混液5 mlを加えてよく振とう抽出する。戸過によつて上清を分離する。その上清1.0 mlをとり、これに0.5 %ジギトニン溶液(50 %エタノール)2 mlを加える。室温で20分間放置後、比濁計で散乱光強度を測定する。

比濁計としては通常のものが使用できるが、レ

(7)

生成させたのち、微粒子による混濁の散乱光強度を測定する。

ジギトニドの生成は弱酸性下で行う。酸としては酢酸の他、希釈した塩酸、硫酸が用いられる。

界面活性剤の添加は、ジギトニドの浮遊を一層安定化させる。界面活性剤としては、ツイーン20、トリトンX-100、トリトンX-405、ブリッジ35などの非イオン界面活性剤が使用できる。界面活性剤は0.01～0.5 %の範囲で添加するが、0.1 %が好ましい例である。

本発明の混濁液の散乱光強度の安定性は、第1図に示すように1時間後も変化がない。

また実施例2に従つてコレステロールを一定量溶解させた標準液を用いた場合の検量線は第2図のとおりである。

本法(実施例2)とコレステロールオキシダーゼ法(チャールス シーアラインら、クリニカルケミストリー、20巻470～475頁 1974年)との測定値の比較を第3図に示したが、血清試料中の総コレステロールの測定値の相関係数が

(9)

レーザー光源を用いるレーザーネフエロメーターが好ましい。

血清中で、コレステロールは3位の水酸基が脂肪酸とエステル結合したエステル型コレステロールとフリーの遊離型コレステロールが存在する。

ジギトニンは遊離型のコレステロールとのみ結合するから、エステル型のコレステロールはあらかじめ加水分解を行う必要がある。前記のアセトン-エタノール抽出液に、水酸化カリウム溶液(アセトン-エタノール溶液)を加えて37℃で加温する。この液を酢酸で中和のち試料とする。

生成したジギトニドは、アセトンあるいはエタノールには溶解しない。他方ジギトニンは上記溶媒に溶解する。ジギトニドの混濁を生ぜしめる溶媒としては、前記の水溶性溶媒のアセトン、エタノールなどを単独、あるいは混合で用いる。好ましくは、生体試料からの抽出にはアセトン-エタノール混液を用い、ジギトニンは50 %エタノール溶液として加える。

一定時間室温にて放置し、ジギトニドを完全に

(8)

0.9441とよい一致がみられた。

以下実施例を示す。

実施例1. 血清中遊離コレステロール含量の測定  
試薬の調整

(1)アセトン-エタノール溶液

アセトン1容とエタノール1容とを混合する。

(2)トリトンX-100溶液

トリトンX-100 10gを水100 mlに溶解する。

(3)酢酸溶液

氷酢酸10 mlに水90 mlを加えて混合する。

(4)ジギトニン溶液

ジギトニン0.5 gを50 %エタノール(含水)100 mlに溶解する。

(5)コレステロール標準液

コレステロールの結晶300 mgを秤り氷酢酸100 mlに溶解する。

この300 mg/dlの標準液をさらに氷酢酸にて適宜希釈し、検量線作成用の標準液を用意する。

(10)

## 測定操作

血清 0.02 ml を微量ビペットで試験管にとる。  
これにアセトン-エタノール混液 5 ml を加え、ミキサーで時々攪拌しながら室温で 10 分間放置する。

ついで遠心分離機で 3000 r.p.m で 10 分間遠沈する。その上清 1.0 ml を別の試験管に移す。

これに酢酸溶液を 1 滴、ならびにトリトン X-100 溶液 1 滴を滴下しよく振り混ぜる。

ついでジギトニン溶液 2.0 ml を加えよく振り混ぜ、室温にて 20 分間放置する。(試料)

別に血清と同様にコレステロール標準液についても操作する。(標準液)

ついで、試料、標準液について散乱光強度を測定し、標準液による検量線から検体の遊離コレステロール含量を読みとる。

## 実施例 2 血清中総コレステロール含量の測定

## 試薬の調製

## (1) アセトン-エタノール溶液

アセトン 1 容とエタノール 1 容とを混合する。

01

これにアセトン-エタノール混液 5 ml を加え、ミキサーで時々攪拌しながら室温で 10 分間放置する。

ついで遠心分離機で 3000 r.p.m で 10 分間遠沈する。その上清 0.5 ml を別の試験管に移す。

水酸化カリウム溶液 0.5 ml を加え、37℃で 30 分間加温する。冷後、これに氷酢酸 0.1 ml を加える。

これにトリトン X-100 溶液 1 滴、ついでジギトニン溶液 2.0 ml を加えよく振り混ぜ、室温にて 20 分間放置する。(試料)

別に血清と同様にコレステロール標準液についても操作する。(標準液)

ついで、試料、標準液について散乱光強度を測定し、標準液による検量線から検体の総コレステロール含量を読みとる。なお、ツイーン 20、ブリッジ 35 は花王アトラス株式会社の商品名、トリトン X-100、トリトン X-405 は Rohm & Haas 社の商品名である。

## 4. 図面の簡単な説明

03

## (2) トリトン X-100 溶液

トリトン X-100、10 g を水 100 ml に溶解する。

## (3) 水酸化カリウム溶液

水酸化カリウム 1 g を水 2 ml に加え、よく振り混ぜ完溶させる。この溶液に、アセトン-エタノール (1 容: 1 容) を加えよく振り混ぜ全容を 25 ml とする。

## (4) 氷酢酸

## (5) ジギトニン溶液

ジギトニン 0.5 g を 50 % エタノール (含水) 100 ml に溶解する。

## (6) コレステロール標準液

コレステロールの結晶 300 mg を氷酢酸 100 ml に溶解する。

この 300 mg/dl の標準液をさらに氷酢酸で適宜希釈し、検量線作成用の標準液を用意する。

## 測定操作

血清 0.02 ml を微量ビペットで試験管にとる。

02

第 1 図は、実施例 1 に従って操作した混濁液の散乱光強度の安定性を示すグラフ、第 2 図は、実施例 2 に従ってコレステロールを一定量溶解させた標準液を用いて描いた検量線、第 3 図は、本法、実施例 2 とコレステロールオキシダーゼ法 (チャールス シーアラインら、クリニカル ケミストリー、20 巻 470~475 頁 1974 年) との相関を示すグラフである。

$r$  : 相関係数

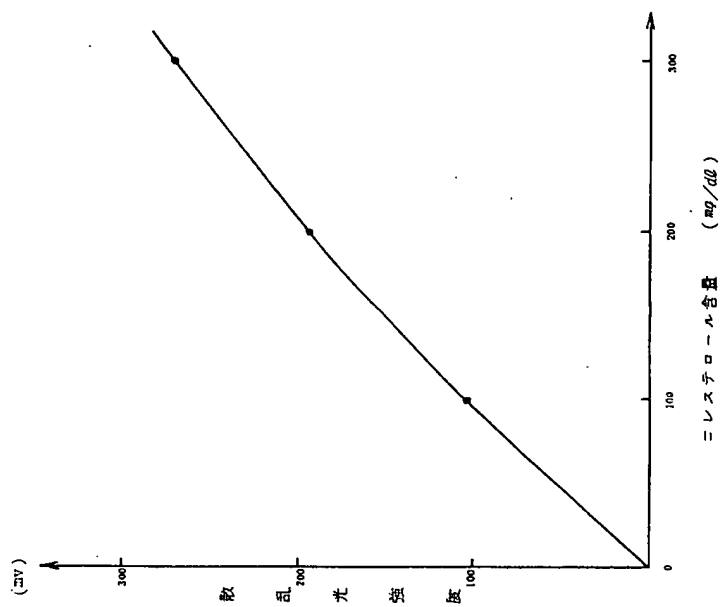
$n$  : 検体数

$y$  : 直線の式

特許出願人 和光純薬工業株式会社

04

第 2 図



第 1 図

